

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

A. Kajian Teori

1. *Mangifera pedicellata* Kosterm.

Mangifera pedicellata adalah tumbuhan langka yang termasuk kedalam daftar merah spesies terancam IUCN. Spesies ini berasal dari Asia Tenggara, tanaman ini tumbuh di hutan tropis yang lembab. Sebelumnya diketahui dari kepulauan Karimun Jawa di Utara Jawa Tengah dan dibudidayakan di Sulawesi Selatan. Klasifikasi *M. pedicellata* di antaranya kingdom plantae, phylum tracheophyta, class magnoliopsida, ordo sapindales, family anacardiaceae, genus *Mangifera* (IUCN, 2024).

Tinggi pohon *M. pedicellata* mencapai 10-17 m. Pohonnya sangat tipis, dengan pangkal yang pendek, berbentuk biji di bagian atas saraf dengan tulang rusuk prominular tipis. Tangkai daun pada tanaman ini panjang dan ramping, mempunyai benang sari tunggal yang berbentuk cakram besar. Mempunyai ranting yang tidak terlalu tebal, malai besar, longgar dan terminal semu, panjangnya mencapai 40 cm, pada poros utama tidak terlalu tebal, mempunyai percabangan yang jauh, panjangnya mencapai 18 cm. Cakramnya besar dan tinggi sekitar 2-3 mm, pada bagian bawah dahan tidak mempunyai bunga. Bunganya bertangkai panjang, namun pada bagian bunganya gundul, lebih kecil dan lebih lembut. Berbeda dengan *M.indica* mempunyai bunga yang tidak berglomerasi, tangkai bunga panjang dan cabang bunga rasemoid, cakram sangat besar serta staminoda yang besar (Kostermans and Bompard, 1993).

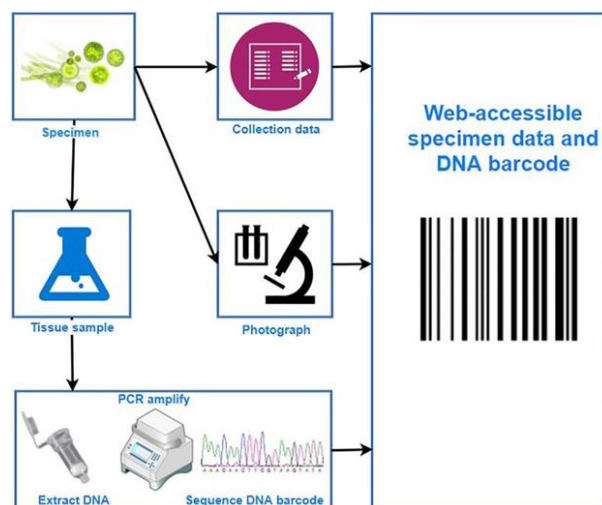


Gambar 2.1 Tanaman *Mangifera pedicellata* Kosterm. Vak XXIV. A. 156 koleksi Kebun Raya Bogor (a) pohon *M. pedicellata* (b) batang *M. pedicellata* (c) daun *M. pedicellata*

2. DNA Barcoding

DNA barcoding merupakan suatu teknik identifikasi spesies memanfaatkan satu atau beberapa daerah DNA standar dalam garis keturuna target serta mempunyai variasi untuk mengenali spesies serta mengidentifikasi individu dengan akurat (Hebert *et al.*, 2003; Kress *et al.*, 2005). Tahapan analisis molekuler pada DNA barcoding merupakan metode penting dalam taksonomi dan identifikasi molekuler. DNA barcoding suatu metode untuk identifikasi organisme menggunakan marka molekuler. Dengan metode ini spesies yang belum diketahui dapat diidentifikasi menjadi spesies yang terdaftar. DNA barcoding digunakan untuk identifikasi makhluk hidup berdasarkan sekuen gen dengan menggunakan sekuen pendek, universal dan akurat untuk identifikasi sampai tingkat spesies. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mendukung DNA barcoding sebagai proses identifikasi spesies tumbuhan, hewan, dan jamur (Kress, 2017).

Menurut (Sunaryo, 2015) prinsip DNA barcoding di antaranya pengambilan sampel dan preservasinya yang bertujuan untuk mendapatkan sampel yang baik agar dalam proses ekstraksi mendapatkan DNA yang berkualitas. Prinsip kerja DNA barcoding mempunyai beberapa tahap di antaranya adalah isolasi DNA dan amplifikasi dari gen target DNA barcode dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Pada tahap ini perlu memakai sepasang primer dari gen yang digunakan yakni *forwaed* dan *reverse*. Proses DNA barcoding di antaranya isolasi DNA, amplifikasi DNA menggunakan alat PCR, visualisasi DNA, dan sekuensing (Gambar 2.2).



Gambar 2.2 Proses identifikasi spesies dengan penanda DNABarcoding (Kowalska *et al.*, 2018).

a. Isolasi DNA

Isolasi DNA adalah teknik untuk memisahkan molekul DNA dari komponen dua prinsip, di antaranya yaitu sentrifugasi dan presipitasi (Octavia *et al.*, 2021). Tujuan Isolasi DNA untuk memisahkan DNA dari partikel-partikel seperti lipid, protein,

polisakarida serta zat yang lainnya. Isolasi DNA berfungsi sebagai analisis molekuler serta rekayasa genetika seperti genom editing, transformasi dan PCR (Heriyadi, 2018). Isolasi DNA merupakan suatu cara untuk mendapatkan DNA murni yang tidak tercampur dengan komponen-komponen sel lain seperti protein dan karbohidrat. Menurut Sunaryo (2015) Isolasi DNA dapat dilakukan dengan metode konvensional atau dengan produk isolasi DNA kit. Metode konvensional bisa dilakukan dengan CTAB dan fenol kloroform, metode ini juga biayanya lebih murah dan menghasilkan DNA dengan kualitas tinggi. Isolasi DNA secara kit menggunakan waktu pengerjaan lebih cepat, namun menghasilkan DNA dengan kualitas rendah (Farnoosh *et al.*, 2013).

b. *Polimerase Chain Reaction (PCR)*

Polimerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA. PCR digunakan untuk mengaplikasikan segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dengan beberapa jam. Prinsip PCR berbasis pada kemampuan enzim polimerase untuk mensintesis DNA baru yang merupakan komplementar dari cetakan DNA. Terdapat tiga tahapan penting dalam proses PCR di antaranya denaturasi yaitu proses pembukaan DNA untai ganda menjadi untai tunggal, *annealing* yaitu penempelan primer, dan pemanjangan primer (*extension*) (Yusuf, 2010). *Polimerase Chain Reaction (PCR)* memerlukan komponen seperti templat DNA, sepasang primer (Suatu oligonukleotida yang komplementar dengan urutan DNA templat), dNTP

(*Deoxynucleotide triphosphates*), buffer PCR, dan enzim polimerase DNA (Sogandi, 1945).

c. Elektroforesis

Elektroforesis adalah teknik memisahkan molekul DNA berdasarkan ukuran, yang melibatkan medan listrik (Syaifudin, 2021). Elektroforesis membutuhkan media pemisah berupa fase diam yaitu gel agarose yang tercampur larutan buffer dan berfungsi untuk menjaga keasaman sampel dalam proses pemisahan (Harahap, 2018).

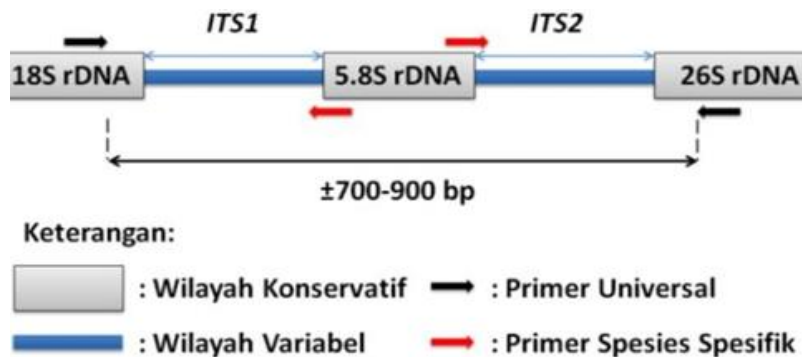
DNA barcoding bertujuan untuk penemuan spesies baru dan identifikasinya, serta penetapan spesimen yang tidak diketahui ke dalam spesies (Herbert *et al.*, 2003). Keunggulan DNA barcoding yakni perlu spesimen yang sangat kecil, mampu mendokumentasikan keragaman taksonomi yang belum di ketahui atau belum pernah diidentifikasi, dan mampu mengungkapkan variasi baru pada spesies yang sebelumnya digolongkan satu spesies (Balke dan Schmidt, 2012; Virgilio *et al.*, 2021). DNA barcoding mempunyai kelebihan yaitu dapat mengidentifikasi spesies yang sulit dibedakan secara morfologi. Identifikasi menggunakan DNA barcoding mampu membedakan antara spesies dengan akurat (Hikam *et al.*, 2021). Dengan adanya teknologi DNA barcoding proses identifikasi lebih mudah, efisien, dan akurat. Beberapa region DNA barcoding di antaranya: *rbcL*, *matK* kedua gen tersebut merupakan penanda DNA barcoding kloroplas (*cpDNA*), sedangkan DNA barcoding inti yang disebut dengan *nuclear ribosomal DNA (nrDNA)* yakni ITS dan *psbA-trnH*. Namun penanda ITS dari genom inti sering

digunakan dalam taksonomi dan filogeni molekuler karena sifatnya mudah diamplifikasi dan mempunyai variasi yang tinggi antar spesies (Martiansyah, 2021).

3. Sekuen *Internal transcribed spacer* (ITS)

Sekuen *internal transcribed spacer* (ITS) adalah *barcode* DNA yang berasal dari DNA ribosom (rDNA). ITS berada di antara prekursor ribosomal yang dihilangkan dalam proses *splicing* ketika RNA prekursor diproses ke dalam suatu ribosom. ITS sebagai penanda molekuler DNA yang sering digunakan oleh para peneliti untuk menganalisis kekerabatan pada tumbuhan tingkat tinggi ataupun tingkat rendah. Keunggulan ITS untuk analisis filogenetik yaitu mempunyai letak berulang di sepanjang DNA genom, mudah bermutasi sehingga terlihat variasi sekuen yang dapat menentukan kekerabatan. ITS mempunyai karakteristik yang unggul, panjangnya sekitar 700 bp serta mempunyai salinan yang banyak di genom inti (Letchuman, 2018).

ITS mempunyai beberapa manfaat seperti identifikasi spesies yang digunakan sebagai penanda molekuler untuk mengidentifikasi spesies serta membandingkan dengan data pada NCBI, analisis filogenetik yang di gunakan untuk membantu dalam menganalisis kekerabatan anatar spesies dan evolusi genetik, memahami karater genetik dan membandingkan data pada NCBI. Pada organisme eukariotik mempunyai dua daerah ITS di antaranya ITS1 dan ITS2. Pada ITS1 terletak diantara subunit kecil sekitar 18S dan 5.8S rDNA, sedangkan ITS2 terletak diantara subunit besar sekitar 26S dan 5.8S rDNA (Gambar 2.2). Ketiga gen inti tersebut mempunyai tingkat konservasi yang tinggi (Yeng *et al.*, 2013).



Gambar 2.3 Wilayah ITS antara 18 rDNA dan 26 rDNA yang mencakup ITS 1, ITS 2, dan 5.8 rDNA.

Menurut Takono dan Okada (2002) region ITS mempunyai tingkat keberhasilan yang lebih tinggi dibandingkan daerah lainnya, maka ITS pada daerah 18S-26S menjadi fokus utama dalam rekonstruksi filogenetik. Locus ITS mempunyai kelebihan sebagai penanda molekuler yaitu untuk mewarisi DNA (Alvarez dan Wendel, 2003). Sekuen ITS efektif untuk identifikasi DNA barcoding pada tumbuhan berbunga, karena mempunyai tingkat keberhasilan amplifikasi lebih tinggi sebesar 88% dibandingkan wilayah plastid (Kress *et al.*, 2005).

B. Hasil Penelitian Relevan

Beberapa penelitian yang relevan dengan penelitian ini yakni dari penelitian Fitmawati (2013). Penelitian tentang analisis filogenetik dari genus *Mangifera* di Sumatera Selatan berdasarkan urutan DNA daerah ITS. Penelitian ini bertujuan untuk merekonstruksi hubungan kekerabatan *Mangifera* berdasarkan wilayah ITS. Penelitian ini menggunakan 13 spesies *Mangifera* dari Sumatera Selatan yang di isolasi dengan CTAB dan analisis filogenetik menggunakan *neighbor joining*. Hasilnya

mennunjukkan bahwa pohon filogenetik terbentuk menjadi kelompok monofilitik dan menunjukkan kekerabatan terdekat antara *M. foetida* dengan *M. odorata*.

Dari penelitian Fitmawati (2018) penelitian tentang analisis filogenetik Mangifera asal Sumatera menggunakan urutan DNA nuklir (nrDNA) dan kloroplas. Penelitian ini bertujuan untuk analisis hubungan filogenetik genus *Mangifera* di Sumatera dengan genera yang berkerabat dekat berdasarkan karakter molekuler. Metode yang digunakan yaitu CTAB dan menggunakan *maximum parsimony* dalam analisis filogenetik. Hasilnya menunjukkan keberhasilan dari 13 Mangifera asal Sumatera menggunakan region ITS. Dengan kontruksi pohon filogenetik menggunakan metode *maximum parsimony* dan menghasilkan kelompok monofiletik.

Dari penelitian Mursyidin (2023) penelitian tentang keanekaragaman genetik mangga dan kekerabatan liarnya (*Mangifera spp*) berdasarkan molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman dan hubungan mangga endemik dengan kerabat liarnya menggunakan daeran ITS. Mursyidin melakukan penelitiannya di Universitas lambung mangkurat dengan metode ekstraksi DNA menggunakan sampel daun DNA kit komersial geneid berbasis ITS dan analisis filogenetik menggunakan metode UPGMA Hasilnya menunjukkan bahwa *Mangifera* memiliki keragaman genetik tinggi sebesar 0,069. Berdasarkan hubungan filogenetik *Mangifera* di kelompokkan menjadi 3 klaster untuk sifat ITS. Hubungan terdekat pada *M. laurina* dan *M.indica*.

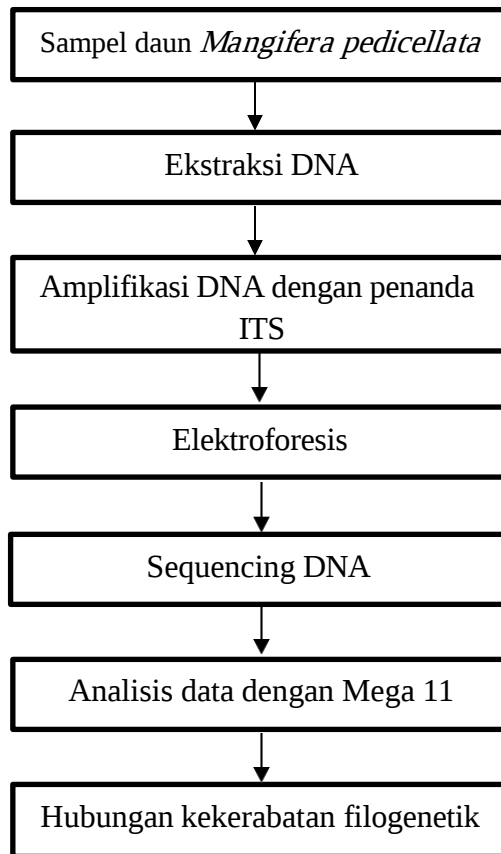
Dari penelitian Fitmawati (2016) penelitian tentang pemanfaatan

ITS sebagai penanda DNA molekuler untuk identifikasi spesies *Mangifera* asal Sumatra Tengah. Bertujuan untuk analisis kekerabatan antar spesies *Mangifera* di Sumatra menggunakan ITS sebagai penanda molekuler. Fitmawati melakukan penelitiannya dengan mengumpulkan sampel di Sumatra Tengah dengan isolasi menggunakan metode CTAB dan analisis filogenetik dengan metode *neighbor joining* dengan *outgroup* dari genus *Anacardiaceae*. Hasil menunjukkan bahwa pada penyelarasan urutan seluruh genus *Mangifera* dan kelompok luar menghasilkan 664 bp dengan 99 untuk situs informatif.

Dari penelitian Resida (2017) penelitian tentang analisis filogenetik spesies *Mangifera kemanga* BL. Dari sumatra dan beberapa spesies terkaitnya menggunakan penanda trnL-F. Objek dari penelitian ini adalah *Mangifera kemanga* yang berasal dari Sumatra. Menggunakan metode ekstraksi DNA berbasis CTAB dengan sedikit modifikasi. Hasilnya menunjukkan bahwa kaldogram analissi *maximum parsimon* (MP) membentuk pohon monofiletik. Sedangkan *nighbor joining* (NJ) membentuk pohon politomi.

C. Kerangka Berfikir

Berdasarkan dari tinjauan pustaka, maka untuk melihat sekuen ITS di Kebun Raya Bogor dilakukan dengan isolasi DNA, *polymerase chain reaction* (PCR), dan elektroforesis. Maka dari itu penelitian ini dilakukan seperti pada kerangka berfikir.



Gambar 2.4 Kerangka Berfikir.